



GenePharma

ShangHai GenePharma Co., Ltd

吉玛重组慢病毒操作手册

GenePharma Recombinant Lentivirus Operation Manual

上海吉玛制药技术有限公司 **ShangHai GenePharma Co., Ltd**

手册目录：

试剂盒清单

产品简介

生物安全

使用方法

运输和储存

常见问题及解决方案

吉玛成功案例

常见细胞慢病毒感染推荐参数

试剂盒清单

使用说明手册	1 份	
病毒液	效价	体积
阴性对照	NC	
阳性对照		

产品简介

目前，我公司慢病毒载体是以国际通用的第三代载体系统为基础，通过一定改建，构成四质粒体系。其中，转移载体（transfer vector）包含转移目的基因的慢病毒骨架及其包装产生相应基因组 RNA 的所有顺式作用元件，并且可以单一或多重组合的稳定或条件诱导性表达转移基因或 shRNA；另外，通过三个辅助质粒，提供病毒包装所需的反式作用因子，同时采用“自我灭活”修饰，阻止子代病毒自我复制和转移，从而确保产生的慢病毒具备良好的生物安全性。

生物安全

1、安全性

（1）删除了全部 HIV-1 的编码基因，在介导目的基因的表达时，没有任何 HIV-1 蛋白的表达；

（2）对 5'和 3' LTR 分别进行了删除改造，5'LTR 缺失 U3，换上 RSV enhancer/promoter，使载体的复制不再依赖 Tat；3'LTR 删除 U3，使其不再具有启动/增强活性，成为自灭活（self-inactivating, SIN）载体；

（3）病毒包装必需的 3 个蛋白 Gag/Pol、Rev、VSV-G（代替 HIV-1 的 Env）分别独立放置在 3 个质粒上（pGag/Pol、pRev、pVSV-G），且互相之间没有任何同源序列，大大降低了复制型慢病毒（RCL）的产生几率；

（4）与 MuLV 等逆转录病毒载体相比，慢病毒载体的整合更偏向于宿主细胞基因组的基因表达活跃区，激活沉默的原癌基因的几率可能比逆转录病毒载体低；

（5）慢病毒载体未发现有致肿瘤活性，全世界有 4 千万人感染了 HIV-1，

发生的整合事件不计其数，但未出现一起致瘤事件，而 MuLV 等逆转录病毒载体有致瘤活性；

（6）慢病毒的 LTR 的转录激活能力低于逆转录病毒，激活原癌基因能力也相对较低。

2、实验室安全措施

慢病毒载体已经被全世界许多实验室应用，没有出现过任何意外，但仍具有潜在的产生复制型慢病毒（RCL）和致癌的风险，操作者在实验中仍需要保持高度警惕！所有操作均应尽量在 BSL2 级生物安全柜中进行，并佩戴一次性口罩和手套，尤其要避免病毒接触口、眼、鼻、耳、伤口等身体开放性区域，避免产生气溶胶，tip 头一定要选择带有滤芯的。必须高度注意被污染的尖锐物品，包括针头、注射器、载玻片、移液管、毛细玻璃吸管和解剖刀。每次实验后，立即清理所有接触过病毒的器具，均应高压消毒再进行下一步处理。显微镜台、生物安全柜台面等使用后，用 70%乙醇擦拭。意外洒落的含病毒的液体，用卫生纸吸干后，用 0.6% 次氯酸钠溶液浸泡被污染处 1h。装盛慢病毒载体的实验用品，要单独放置，标示清楚，并标注“危险品”字样。尽量使用培养瓶，使用培养板来感染病毒，要防止意外洒落。对共用实验室的人员进行慢病毒安全培训或提示。

使用方法

Lentivirus 在细胞水平使用

GenePharma 提供的重组 Lentivirus 颗粒是以 VSV-G 膜蛋白包裹，从

而大大增加了病毒感染谱，但对不同组织细胞亲嗜性仍有差别，因此，有必要在使用 Lentivirus 颗粒之前请查阅有关文献，了解 Lentivirus 对靶细胞的亲嗜性、感染复数（MOI 值）及体内（in vivo）注射所需的病毒量，若无相应文献支持，则需要检测病毒对靶细胞的亲嗜性。

1、病毒滴度复核（有限稀释法测定）

（1）滴度检测前一天，对 293T 细胞传代，96 孔板每个孔加入约 $0.5 \sim 10 \times 10^3$ 个细胞，体积 100ul；

（2）第二天，准备 7~10 个无菌 EP 管，在每个管中加入 90ul 的新鲜完全培养基（高糖 DMEM+10%FBS）；

（3）取待测定的病毒原液 10ul 加入到第一个管中，轻轻混匀后，取 10ul 加入到第二个管中，然后依次操作直到最后一管；

（4）选取所需的细胞孔，吸弃 90ul 培养液，然后将稀释好的病毒液，从低浓度到高浓度依次加入，放入 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养；

（5）48 小时后，每孔加入 100ul 新鲜培养液，小心操作，不要吹起细胞；

（6）3~4 天后，观察荧光表达情况，正常情况下，荧光细胞数随稀释倍数增加而相应减少，计数最后二个含有荧光细胞的孔中的荧光细胞个数，将得到的数值除以各自相应的稀释倍数，即可计算出病毒原液的滴度值（通常以倒数第二个孔中的读数值更为准确）。

注释：

（1）典型的病毒滴度测定结果见图一（Fig. 1）；

（2）病毒滴度测定结果还依赖于本身实验系统，如 293T 细胞代数、细胞状态、荧光显微镜品质、相关实验试剂及实验人员操作技能，因此不

同实验室测得滴度数值会有所差异（1~5 倍），但基本不会影响正常实验流程；

（3）病毒滴度(BT = TU/ml, transducing units)计算公式： $TU/\mu l = (P \times N / 100 \times V) \times 1/DF$ ， $P = \% GFP^+ cells$ ， $N =$ 转染时的细胞数， $V =$ 每孔加入病毒稀释液体积（ μl ）， $DF =$ 稀释因子（dilution factor）= 1 (undiluted)、10⁻¹ (diluted 1/10)、 10⁻² (diluted 1/100)。

常用慢病毒滴度检测方法比较

名称	原理	单位	特点	优缺点	与 GFP 荧光法相比
p24 核心蛋白定量法	ELISA Kit	ng p24/ml LP/ml TU/ml（估计）	物理（颗粒）滴度	经典方法，简单、重复性好	高估 10 ² ~10 ³ 倍 3
RNA 基因组定量法	RT-qPCR	RNA/ml、 Vg/ml TU/ml（估计）	物理（核酸）滴度	精度高，但对仪器和操作要求高	高估 10 ² ~10 ⁴ 倍 2
GFP 荧光计数法	FACS（流式细胞计数）	TU/ml	感染滴度	经典方法，简单、重复性好	—
抗性克隆计数法	细胞克隆计数	TU/ml	感染滴度	克隆形成需约 2 周	低估 5~10 倍 3
Dot-blot 法	RNA dot-blot	RNA/ml	物理（核酸）滴度	简单，但属于半定量	
DNA 定量法	感染细胞后定量载体 DNA	TU/ml	感染滴度	最接近真实感染滴度，但不同细胞感染效率不同	约为 RNA 基因组定量法的 1/1000

2、 靶细胞感染预实验

- 1) 试验前一天分别接种 3~5×10³ 个目的细胞与 96 孔培养板每孔中，所加培养基体积为 100uL.不同种类的细胞生长速度有所差异，为保证有较好的实验结果，进行病毒感染时细胞的融合度为

30~50%。因为慢病毒表达时间较长，故在进行感染实验时细胞接种不宜过密。

- 2) 干扰预试验共分为二组,每组均有不同梯度的 MOI 值(Multiply of Infection)。第一组为正常情况下感染,也就是在完全培养基中直接加入病毒。第二组为感染时添加 5 μ g/mL 的 Polybrene, Polybrene 在大部分细胞中可以有效的提高感染效率。
- 3) 感染前为细胞换液,吸去细胞上清,按不同的分组情况加入所需的培养基 90 μ L,每组三个孔。
- 4) 准备 2 个无菌的 EP 管,吸取 10 μ L 的 1×10^8 TU/ml 的病毒(预先从 -80 $^{\circ}$ C 取出在冰上融化)加入到第一个管子中,轻柔混匀,勿产生泡沫。同样从第一管中吸取 10 μ L 的病毒到第二管中,混匀。这样就得到了三个不同梯度的病毒:原液,10 倍稀释,100 倍稀释。
- 5) 将三个不同梯度的病毒液,各取 10 μ L 加到每组的三个孔中,计算可知,三个孔的 MOI 分别为 100, 10, 1.如果所用的病毒滴度未达到 1×10^8 TU/ml,则相应增加病毒体积使得能够得到不同的 MOI。
- 6) 把细胞放回培养箱孵育
- 7) 8-12 小时以后请观察细胞状态。如果细胞状态与未感染组无明显差异,表明慢病毒对细胞没有明显毒性作用,请不要换液,继续培养,24 小时后更换为新鲜培养基。
- 8) 感染 72-96 小时后,观察荧光表达情况。对于生长迟缓代谢慢的细胞,可以适当延长观察时间,中途可以换液保持细胞的良好状

态。

9) 以上的操作是针对贴壁细胞设计的。悬浮细胞的区别主要在细胞的分盘上，它不需要提前一天分盘。操作时直接将细胞离心后悬浮在不同的培养基中，计数分盘后，即可加入病毒。

10) 通过首次实验和重复实验，确认目的细胞的感染方法和感染参数。

3、正式试验

通过预实验可以帮助确定使用重组 Lentivirus 颗粒感染目的细胞的优化条件，如细胞接种密度，是否需要添加 Polybrene，合适的 MOI 值等参数。正式实验前，调整并保持细胞的良好状态是非常重要的。有些对 Polybrene 敏感，这时候就不能添加 Polybrene 去增强感染效率。

Lentivirus 表达时间较长，但在一般代谢较旺盛的细胞（如 293T，BHK21 等）上，病毒感染 24hrs 后可以观察到 GFP 荧光；代谢比较缓慢的细胞（如原代培养细胞，神经干细胞，胚胎干细胞等）GFP 蛋白表达时间较长，感染后 72-96hrs 甚至更长时间才可以观察到 GFP 荧光。感染后的细胞可以连续培养一周，通过观察 GFP 的表达时间和表达强度来确定 Lentivirus 对目的细胞的感染情况。感染后期请根据细胞生长的情况对细胞进行及时换液和传代，以保证细胞良好的生长状态。

运输和储存

对于长距离运输，应先将慢病毒载体保存在-80℃，再采用全程干冰运输，以防滴度下降。

慢病毒载体在-80℃保存 6 个月，滴度不会明显下降。建议保存 6~12 个月以上的样品，进行实验前，重新测一次滴度。应尽量避免反复冻融（小于 3 次）。

使用前从-80℃取出病毒，立即放在 37℃水浴锅中，轻轻晃动，使其尽快溶解，操作过程应置于冰盒上进行。用不完的病毒可以暂时放在 4℃冰箱中，但最好尽快用完。

常见问题及解决方案：

1、 通常在转移载体中最大能够插入多大的目的基因序列？

基于 HIV 基因骨架的原因，通常插入的目的基因序列要小于 4kb，否则会影响病毒滴度甚至基因表达。

2、 Lentivirus 对目的细胞的感染效率很低，如何提高病毒的感染效率？

一般，我们通过提高 MOI 值来提高病毒的转染效率，必要时以在培养基中加入 Polybrene (4-8μg/ml) 来提高病毒的感染效率。同时，目的细胞良好的生长状态是获得正常感染效率的保证。

3、 目的细胞可以被 Lentivirus 感染，但是 GFP 荧光强度很弱，为什么？

目的细胞中 GFP 荧光轻度取决于病毒感染细胞的颗粒数、细胞本身的增殖状态、细胞类型以及观察时间等。一般来讲，目的细胞感染病毒颗粒数越多，细胞本身增殖越快，GFP 荧光会越强。Lentivirus 属于慢病毒，一般在增殖较快的细胞中病毒感染 72-96h 后，GFP 基因表达才达到高峰。对于增殖较慢的细胞，GFP 基因表达时间还

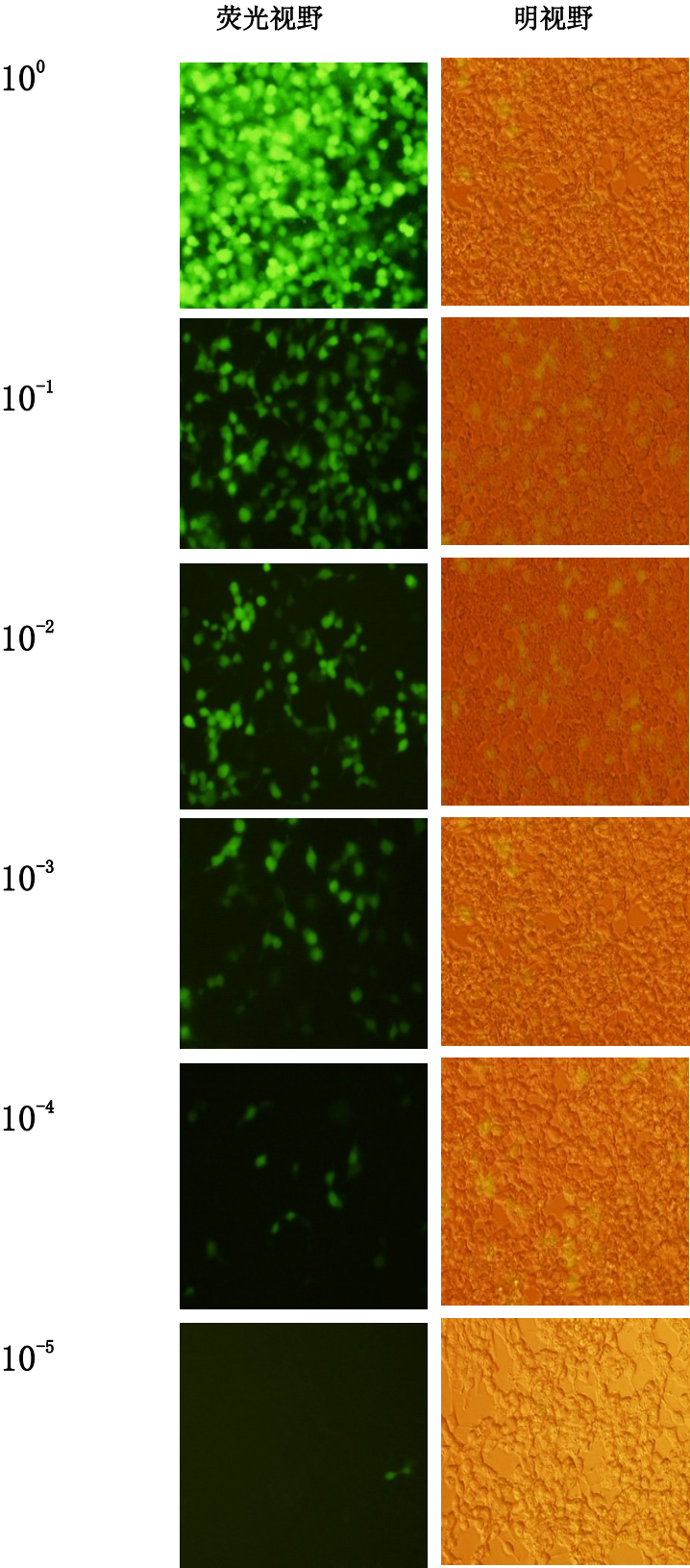
会延长。

- 4、 加入病毒后，目的细胞死亡很厉害，为什么？

Lentivirus 可能对您的目的细胞有一定的毒性，请调整并降低感染的 MOI 值，并且在 4hrs, 8hrs 或者 12hrs 后对细胞进行换液，用新鲜的完全培养液继续培养观察。

吉玛案例

病毒滴度测定:



吉玛实验室细胞推荐 Lentivirus 感染参数：

细胞系慢病毒感染参数			
名称	ATCC No.	细胞类型及来源	达到 80%感染所需 MOI
293T	CRL-11268	人胚胎肾细胞	<1
95D	——	人高转移肺腺癌细胞	3
CNE-1	——	人鼻咽癌细胞（高分化）	50
hADSC	——	人脂肪肝细胞	100
HEC-1A	HTB-113	人子宫内膜癌细胞	5
HepG-2	——	人喉表皮样癌细胞	20
hFOB1.19	——	永生化人成骨细胞	2
HL-60	CCL-240	人骨髓细胞白血病细胞	50
HLE-B3	——	人晶状体上皮细胞	1
hMSC	——	人骨髓间充质干细胞	50
hSMC	——	人平滑肌细胞	50
HUVEC	——	人脐静脉内皮细胞	5
Jurkat	TIB-152	人白血病细胞	100
MCF-7	HTB-22	人乳腺腺癌细胞	5
MDA-MB-231	HTB-26	人乳腺癌细胞	10
SaoS-2	——	人成骨肉瘤细胞	20
SGC-7901	——	人胃癌细胞	5
SHG-44	——	人胶质瘤细胞	10
SKOV-3	HTB-77	人卵巢癌细胞	3
SMMC-7721	——	人肝癌细胞	1
SPC-A-1	——	人肺腺癌细胞	10
THP-1	TIB-202	人单核细胞	100
U251	——	人胶质瘤细胞	1
U-20S	HTB-96	人骨癌细胞	5
U937	CRL-1593.2	人组织细胞淋巴瘤细胞	50
HSC-T6	——	永生化大鼠肝星型细胞	3
PC-3	CRL-1721	人前列腺癌细胞	100
A549		人肺癌细胞	
H9c2(2-1)	CRL-1446	大鼠心肌细胞	1
KM3	——	大鼠骨髓瘤细胞(B 淋巴细胞)	50
原代培养细胞慢病毒感染参数			
细胞名称	种属	细胞类型及来源	达到 80%感染所需 MOI
甲状旁腺原代细胞	人	甲状旁腺组织	50
胚胎间骨髓核细胞	人	胚胎组织	5
血管平滑肌细胞	大鼠	血管平滑肌	>100
胶质细胞	大鼠	脑组织 0	5

上海吉玛制药技术有限公司

联系电话: 021-51320195,51370738,51370739

传真:021-51320295

公司地址: 上海浦东新区张江高科技园区哈雷路 1011 号

邮编:201203

网 址 : www.genepharma.com

E- MAIL :service@genepharma.com

苏州吉玛基因药物科技有限公司

地址: 苏州工业园区星湖街 218 号生物纳米园 A3 幢

电话: 0512-6295 6678

传真: 0512-6295 6679

网 址 : www.genepharma.com